

COMUNICACIÓN

Meningoencefalitis causada por *Mycobacterium bovis* en un ternero. Reporte de caso

Meningoencephalitis caused by *Mycobacterium bovis* in a calf. Case report

Lucía del Carmen Favila-Humara¹, Marco Antonio Santillán-Flores^{1,2}, María Guadalupe Martínez-Serrano¹, José Francisco Morales-Álvarez¹

RESUMEN

Se describe un caso clínico de meningoencefalitis tuberculosa en un ternero Holstein de cinco meses de edad que presentaba signología nerviosa; además de pertenecer a un hato con 30% de prevalencia a tuberculosis. Se llevó a cabo la eutanasia del animal y se practicó la necropsia. No se encontraron lesiones en órganos de cavidad torácica ni abdominal. Se tomaron muestras de encéfalo para estudios de histopatología (tinción con hematoxilina-eosina y Zielh Nelsen), bacteriología y PCR-MRD1. En el encéfalo se observaron lesiones inflamatorias macroscópicas con congestión y aspecto granular en meninges, así como adherencias fibrosas en la zona ventral. Microscópicamente se observó infiltrado inflamatorio, linfocitos, macrófagos, células epitelioides, células plasmáticas y células gigantes multinucleadas, áreas de necrosis central, mineralización distrófica y bacilos ácido-alcohol resistentes. La meningoencefalitis granulomatosa por *Mycobacterium bovis* se confirmó por aislamiento bacteriano y PCR-MRD1.

Palabras clave: tuberculosis bovina, meningoencefalitis, *Mycobacterium bovis*, PCR

ABSTRACT

A clinical case of tuberculous meningoencephalitis in a 5-month-old Holstein calf that presented nervous symptoms is described. The calf was part of a herd with a 30%

¹ CENID Microbiología Animal, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas Forestales y Pecuarias INIFAP, Colonia Pal Alto, Cuajimalpa, México

² E-mail: mayco1768@gmail.com

Estudio parcialmente financiado por el Proyecto 3217251P «Identificación de las principales enfermedades infecciosas emergentes en ganado lechero en México». Recursos fiscales INIFAP

Recibido: 11 de mayo de 2020

Aceptado para publicación: 18 de noviembre de 2020

Publicado: 23 de febrero de 2021

prevalence of tuberculosis. The animal was euthanized, and a necropsy was performed. No lesions were found in organs of the thoracic or abdominal cavity. Brain samples were taken for histopathology (hematoxylin-eosin and Zielh Nelsen staining), bacteriology and PCR-MRD1 studies. In the brain, macroscopic inflammatory lesions with congestion and granular appearance were observed in the meninges, as well as fibrous adhesions in the ventral area. Microscopically, inflammatory infiltrate, lymphocytes, macrophages, epithelioid cells, plasma cells and multinucleated giant cells, areas of central necrosis, dystrophic mineralization and acid-fast bacilli were observed. Granulomatous meningoencephalitis due to *Mycobacterium bovis* was confirmed by bacterial isolation and PCR-MRD1.

Key words: bovine tuberculosis, meningoencephalitis, *Mycobacterium bovis*, PCR

INTRODUCCIÓN

Mycobacterium bovis (*M. bovis*) es el agente etiológico de la tuberculosis bovina (TB), enfermedad que se caracteriza por producir lesiones granulomatosas principalmente en linfonodos de cabeza, cuello, tórax y pulmón, además de otros tejidos. Afecta a una amplia gama de animales domésticos y silvestres, así como al humano (Corner, 2006, Michel *et al.*, 2010). La tuberculosis bovina sigue siendo una de las enfermedades que más afecta la producción pecuaria de países en desarrollo, con importantes efectos en la salud humana y animal.

Las principales vías de infección de *M. bovis* son las vías respiratoria y alimentaria. La transmisión alimentaria puede explicarse por la práctica común de alimentar a los becerros recién nacidos con calostro procedente de vacas rectoras a tuberculosis, o con leche de tanque que puede estar contaminada con leche de vacas con mastitis tuberculosa (Neill *et al.*, 1994; Houlihan *et al.*, 2008). Se han descrito rutas adicionales de transmisión como infección cutánea por heridas, congénitas y rutas sexuales, que pueden conducir a lesiones extrapulmonares (Neill *et al.*, 1994). La infección tuberculosa prenatal está altamente asociada con la presentación de lesiones tuberculosas en el útero o la placenta (Ozyigit *et al.*, 2007). La infección puede

propagarse a través de las venas umbilicales y por la ingestión o aspiración de líquido amniótico contaminado en el útero o durante el parto (Neill *et al.*, 1994; Ozyigit *et al.*, 2007). La infección tuberculosa congénita puede ocasionar enfermedad en becerros jóvenes, lo cual se ha descrito con poca frecuencia. Existen informes previos de neumonía grave con lesiones granulomatosas en pulmón, hígado y ganglios linfáticos en becerras de 15 y 45 días de edad (Vural y Tunca; 2001; Ozyigit *et al.*, 2007). Asimismo, Oruc (2005) y Roels *et al.* (2003) reportaron casos de tuberculosis meníngea bovinos adultos.

El presente reporte describe un caso clínico de meningoencefalitis tuberculosa en un ternero de cinco meses de edad, procedente de un hato lechero con antecedentes de 30% de prevalencia de tuberculosis.

CASO CLÍNICO

Un ternero Holstein Friesian de cinco meses, que mostró signos neurológicos como falta de coordinación, apatía, inclinación lateral de la cabeza y salivación excesiva fue presentado para su evaluación clínica. El animal era parte de un hato lechero con antecedentes de 30% de prevalencia a tuberculosis, que se encuentra ubicado en Río Verde, San Luis Potosí, México. La madre del ternero

fue diagnosticada como reactor TB mediante la prueba cervical comparativa de tuberculina. Se realizó la necropsia del animal luego que el propietario autorizó el sacrificio humanitario. Se tomaron muestras de encéfalo para el diagnóstico de laboratorio.

Pruebas de Laboratorio

Histopatología

El tejido nervioso se fijó en formalina tamponada al 10%, y fue procesado por métodos de inclusión en parafina estándar, haciendo cortes de 5 µm de espesor que se fijaron en láminas portaobjetos y teñidas con hematoxilina-eosina (HE) y Ziehl Nielsen (ZN) para bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) (Corner, 1994).

Bacteriología

Se realizó el cultivo bacteriológico en medio de cultivo de agar sangre y agar chocolate para el aislamiento de *Listeria* e *Histophilus*, respectivamente (OIE, 2012a).

Para el aislamiento de *M. bovis*, la muestra de encéfalo se maceró y descontaminó utilizando el método modificado de Petroff (Payeur *et al.*, 1992). Las muestras se sembraron en dos tubos de medio de cultivo Stonebrink y uno de Löwenstein-Jensen. Los medios de cultivo permanecieron a 37 °C durante nueve semanas. La identificación de *M. bovis* se realizó con pruebas bioquímicas y frotis teñidos con ZN (Payeur *et al.*, 1992).

Diagnóstico de rabia

Se enviaron muestras del encéfalo frescas al Laboratorio Nacional de Referencia (CENASA-México) y se realizó el ensayo de anticuerpos fluorescentes (FAA) (OIE, 2012b).

Prueba molecular

La extracción de ADN se realizó a partir de la muestra de encéfalo con el paquete-

comercial DNeasy® para extracción de ADN de tejido y sangre (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN se usó para llevar a cabo la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa Multiplex (PCR-MRD1) usando los oligonucleótidos específicos que amplifican un fragmento de 200 pb de la región RD1 en *M. bovis* BCG y de 150 pb para el complejo *M. tuberculosis*. Se incluyeron como controles positivos DNA de *M. bovis* BCG Cepa Pasteur (ATCC #35734) y *M. bovis* AN5 (ATCC #35726) (Talbot *et al.*, 1997; Ramírez *et al.*, 2004).

RESULTADOS

Hallazgos Macroscópicos

No se detectaron lesiones sugestivas o cambios macroscópicos visibles en piel, tejido subcutáneo, cuello ni en órganos de la cavidad torácica y abdominal. En el encéfalo se observó una lesión inflamatoria con congestión, aspecto granular en meninges y adherencias fibrosas en la zona ventral del encéfalo (Figura 1a,b); así como la presencia de varios nódulos pequeños (menores de 1.0 cm³) en la corteza cerebral y bulbo raquídeo. Las lesiones eran ligeramente amarillentas, casi redondeadas, bien delimitadas y suaves (Figura 1c). El líquido cefalorraquídeo era abundante y sanguinolento.

Hallazgos Histopatológicos

Microscópicamente se observó un infiltrado inflamatorio multifocal, compuesto por linfocitos, macrófagos, células epitelioides y células gigantes multinucleadas, rodeadas por una cápsula fibrosa externa. Se observó un área de necrosis caseosa y mineralización distrófica en el centro de las lesiones. Los BAAR se visualizaron mediante tinción de ZN en las áreas necróticas o en el citoplasma de células gigantes multinucleadas y epitelioides. El diagnóstico morfológico se

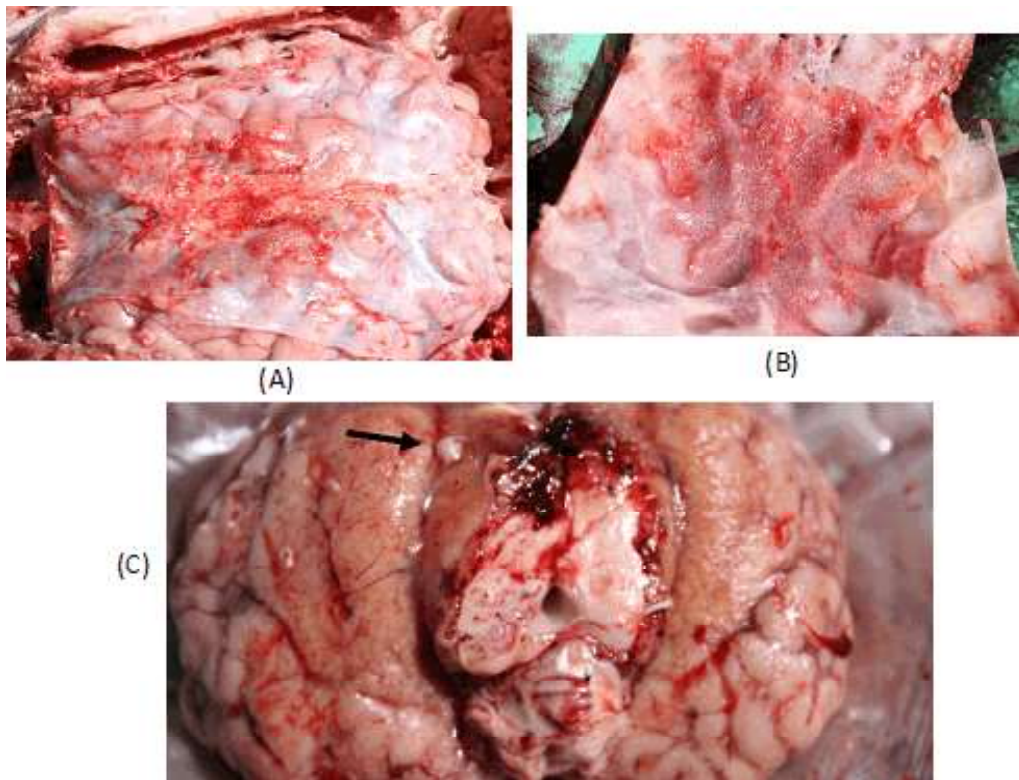


Figura 1. Lesión macroscópica en cerebelo de un ternero Holstein de 5 meses con sospecha de meningoencefalitis causada por *Mycobacterium bovis*. (A) Engrosamiento nodular de meninges, con hemorragia y congestión difusa moderada; (B) Hemorragia subdural con presencia de adherencias; (C) Médula oblonga con congestión difusa, petequias y presencia de un nódulo granulomatoso (flecha)

estableció como meningoencefalitis granulomatosa con bacilos ácido-alcohol resistentes compatibles con tuberculosis (Figura 2).

Pruebas Microbiológicas

No se obtuvo aislamiento bacteriano de *Listeria* ni de *Histophilus*. La prueba de anticuerpos fluorescentes (FAA) para rabia fue negativa. Se detectó el crecimiento de colonias micobacterianas en los tubos de medio de cultivo de Stonebrink en la cuarta semana de incubación, donde la tinción de Ziehl-Neelsen permitió la detección de los BAAR. Los resultados de las pruebas bioquímicas clasificaron el aislamiento como *M. bovis*.

PCR-MRD1

Se obtuvo un producto de amplificación de 150 pb correspondiente al complejo *M. tuberculosis* en el PCR-MRD1 a partir del ADN del encéfalo del ternero (Figura 3).

DISCUSIÓN

Se han descrito casos excepcionales de meningitis por *M. bovis* en humanos, jabalíes y ganado, pero la patogenia de esta presentación de tuberculosis en tejido nervioso sigue sin estar bien definida (Roels *et al.*, 2003; Oruc, 2005; Evans *et al.*, 2007; García-Sánchez *et al.*, 2007).

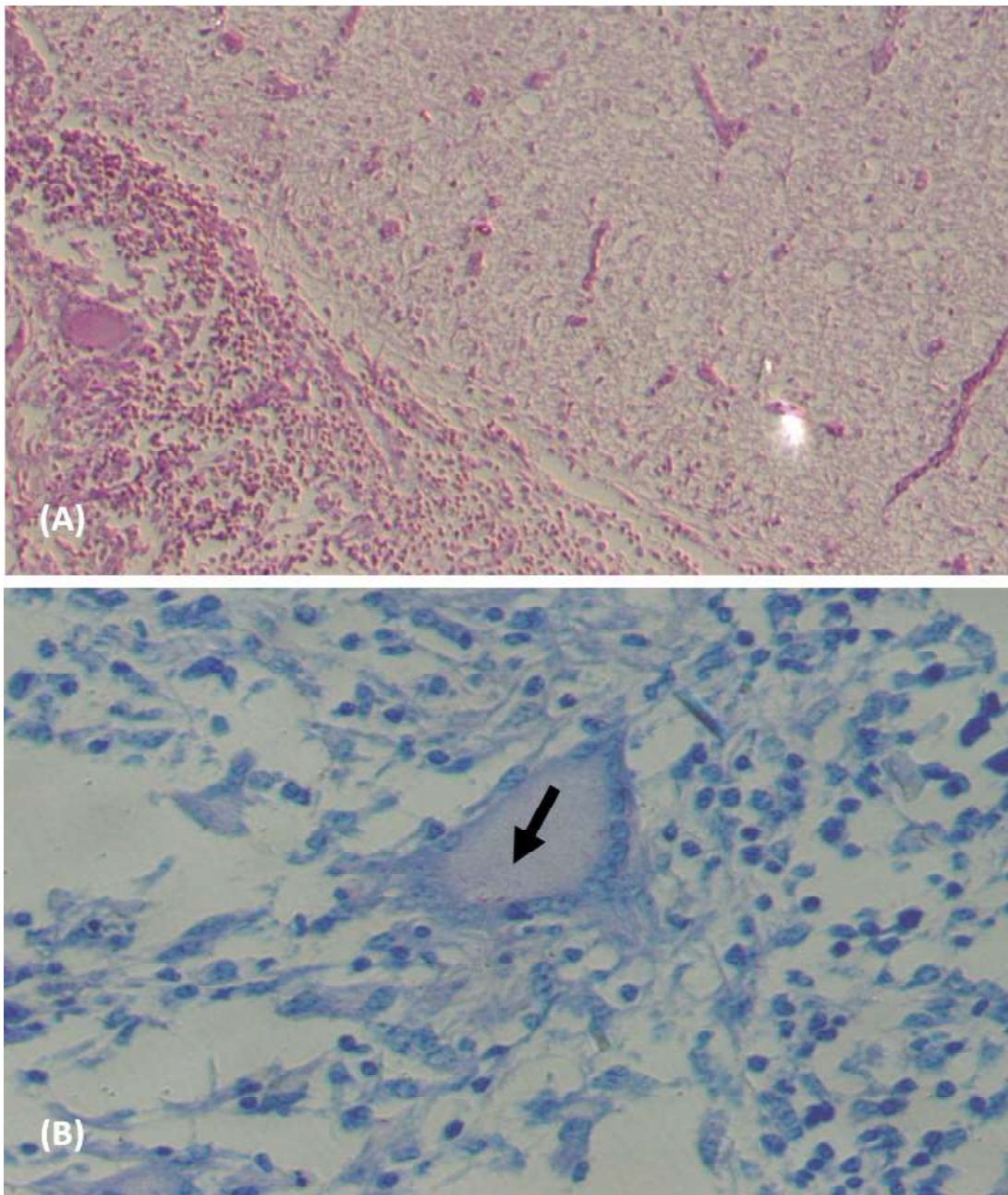


Figura 2. Fotomicrografía de corte histopatológico del encéfalo de un ternero Holstein de 5 meses con sospecha de meningoencefalitis causada por *Mycobacterium bovis*. (A) Infiltrado inflamatorio granulomatoso compuesto por macrófagos epitelioides y células gigantes multinucleadas, adyacentes a un área de degeneración difusa del neuropilo. Tinción HE, 100x; (B) Presencia de células epitelioides, y células gigantes multinucleadas con bacilos ácido alcohol resistentes intracitoplasmáticos (flecha). Tinción Ziehl Nielsen (ZN), 100x

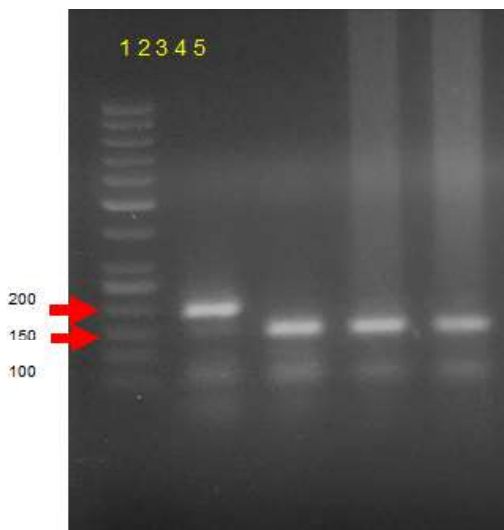


Figura 3. PCR-M RD1 realizado a partir de muestras de DNA del encéfalo de un ternero con meningoencefalitis tuberculosa. Carriles 1) Peso molecular (50 bp), 2) Control + BCG cepa Pasteur (200 pb), 3) Control + *M. bovis* AN5 ATCC (150 pb), 4 y 5) muestras del encéfalo de ternero (150 pb). Gel de agarosa 1.5%, teñido con bromuro de etidio

El presente reporte describe la distribución de lesiones atípicas y los signos clínicos neurológicos en un ternero de cinco meses de edad con meningoencefalitis tuberculosa. No se detectó lesión tuberculosa primaria en pulmón, linfonodos, hígado o intestinos durante la inspección clínica. Las lesiones se presentaron principalmente en meninges craneales, lo que sugiere diseminación hematogena. Por lo general, las lesiones iniciales se producen en las meninges basilares, extendiéndose a través de los espacios aracnoideos hasta el plexo coroideo y los ventrículos (Oruc, 2005). Las apariencias macroscópicas e histopatológicas de las lesiones fueron similares a las descripciones previas de tuberculosis en el sistema nervioso central (Roels *et al.*, 2003; Oruc, 2005).

La rápida progresión de la enfermedad puede explicarse debido a la infección congénita con elevada presencia del patógeno (García-Sánchez *et al.*, 2007; Tomar *et al.*, 2008; Nelson y Zunt, 2011). El ganado infectado experimentalmente con dosis altas de *M. bovis* (5×10^5 ; 1×10^6 unidades formadoras de colonias) desarrollaron enfermedad fulminante y lesiones pulmonares extensas en solo semanas después de la inoculación intranasal o intratraqueal, mientras que la infección a dosis bajas produce lesiones pequeñas sin signos de infección (Neill *et al.*, 1988; Buddle *et al.*, 1994). Además, se ha propuesto que la infección con cepas de *M. bovis* con mayor virulencia podría aumentar el riesgo de diseminación hematogena e infección del sistema nervioso central (Neill *et al.*, 1994; Hernández-Pando, 2011).

La madre del becerro dio positivo en la prueba de tuberculina intradérmica; sin embargo, el animal no estuvo disponible para la confirmación de la enfermedad durante la evaluación del presente caso, de allí que no se pudo comprobar la posible infección uterina. Los criterios de diagnóstico para la tuberculosis congénita implican el diagnóstico en los primeros días o semanas de vida (Neill *et al.*, 1994; Tomar *et al.*, 2008). Se ha propuesto el término tuberculosis perinatal, ya que es difícil distinguir la tuberculosis verdaderamente congénita de la tuberculosis posnatal temprana adquirida, la cual no difiere mucho en cuanto a la presentación clínica y el pronóstico (Tomar *et al.*, 2008). El curso clínico a menudo es fulminante y se caracteriza por diseminación rápida y la presentación de meningitis (Neill *et al.*, 1994; Starke y Smith, 2001).

El hato de procedencia del ternero está ubicado en una región que se considera como endémica de rabia paralizante bovina. En un principio se tuvo la sospecha de rabia o de una encefalitis bacteriana, pero los resultados de laboratorio, tanto de la prueba de

anticuerpos fluorescentes y la bacteriología para el aislamiento de *Listeria* e *Histophilus* fueron negativos. En este caso, la alta prevalencia de tuberculosis en el hato pudo haber facilitado la infección por *M. bovis* o la reinfección posparto. Por lo tanto, la contaminación ambiental y la práctica de alimentar a los terneros con leche de tanque a granel podría haber aumentado el riesgo de infección y la presentación poco común de la meningoencefalitis tuberculosa en el ternero.

La tuberculosis meníngea en el ganado bovino se ha propuesto como diagnóstico diferencial de la encefalopatía bovina (EEB), otra enfermedad crónica del ganado (Roels *et al.*, 2003). La tuberculosis debe incluirse en el diagnóstico clínico diferencial en los bovinos que muestran signos clínicos neurológicos en hatos con alta prevalencia de tuberculosis.

LITERATURA CITADA

1. **Buddle BM, Aldwell FE, Pfeffer A, de Lisle GW. 1994.** Experimental *Mycobacterium bovis* infection in the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*): pathology, haematology and lymphocyte stimulation responses. *Vet Microbiol* 38: 241-254. doi: 10.1016/0378-1135(94)90005-1
2. **Corner LA. 1994.** Postmortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet Microbiol* 40: 53-63. doi: 10.1016/0378-1135(94)90046-9
3. **Corner LA. 2006.** The role of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestic animals: how to assess the risk. *Vet Microbiol* 112: 303-312. doi: 10.1016/j.vetmic.2005.11.015
4. **Evans JT, Smith EG, Banerjee A, Smith RM, Dale J, Innes JA, Hunt D, Tweddell A, et al. 2007.** Cluster of human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*: evidence for person-to-person transmission in the UK. *Lancet* 369: 1270-1276. doi: 10.1016/S0140-6736(07)60598-4
5. **García-Sánchez A, Gómez L, Fernández-Llario P, Parra A, De Mendoza JH. 2007.** Tuberculous meningoencephalitis in a wild boar. *J Wildlife Dis* 43: 780-783. doi: 10.7589/0090-3558-43.4.780
6. **Hernández-Pando R. 2011.** Modelling of cerebral tuberculosis: hope for continuous research in solving the enigma of the bottom billion's disease. *Malays J Med Sci* 18: 12-15.
7. **Houlihan MG, Dixon FWW, Page NA. 2008.** Outbreak of bovine tuberculosis featuring anergy to the skin test, udder lesions and milk-borne disease in young calves. *Vet Rec* 163: 357-361. doi: 10.1136/vr.163.12.357
8. **Michel AL, Müller B, van Helden PD. 2010.** *Mycobacterium bovis* at the animal-human interface: a problem, or not? *Vet Microbiol* 140: 371-381. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.08.029
9. **Neill SD, Hanna J, O'Brien JJ, McCracken RM. 1988.** Excretion of *Mycobacterium bovis* by experimentally infected cattle. *Vet Rec* 123: 340-343. doi: 10.1136/vr.123.13.340
10. **Neill SD, Pollock JM, Bryson DB, Hanna J. 1994.** Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet Microbiol* 40: 41-52. doi: 10.3389/fvets.2017.00247
11. **Nelson CA, Zunt JR. 2011.** Tuberculosis of the central nervous system in immunocompromised patients: HIV infection and solid organ transplant recipients. *Clin Infect Dis* 53: 915-926. doi: 10.1093/cid/cir508
12. **[OIE] World Organization for Animal Health. 2012a.** Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees). Chapter 2.9.7 *Listeria monocytogenes*. [Internet]. Available in: <https://www.oie.int/doc/ged/d12009.pdf>

13. [OIE] *World Organization for Animal Health*. 2012b. Organization International of Epizootias OIE (2012b). Chapter 2.1.13 Rabies. [Internet]. Available in: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/pdf/2.01.13_RABIES.pdf
14. **Oruç E.** 2005. Meningoencephalitis tuberculosa in a Holstein cow. *Vet Pathol* 42: 856-858. doi: 10.1354/vp.42-6-856
15. **Ozyigit MO, Senturk S, Akkoc A.** 2007. Suspected congenital generalized tuberculosis in a newborn calf. *Vet Rec* 160: 307-308. doi: 10.1136/vr.160.9.307
16. **Payeur B, Jarnagin JL, Marquardt JC.** 1992. Laboratory methods in veterinary mycobacteriology for the isolation and identification of mycobacteria. USA: USDA.
17. **Ramírez CIC, Santillán FMA, Arriaga DC, Arellano RB, Morales AJF.** 2004. Empleo de una PCR-multiplex para diferenciar caprinos vacunados con *M. bovis* BCG, de infectados con *M. bovis* de campo. *Rev Mex Cienc Pecu* 42: 419-428.
18. **Roels S, Walravens K, Saegerman C, Thelissen M, Vanopdenbosch E, Godfroid JK.** 2003. *Mycobacterium bovis* meningitis in a cow with clinical signs of BSE. *Vet Rec* 152: 807-808. doi: 10.1136/vr.152.26.807
19. **Starke RS, Smith MH.** 2001. Tuberculosis. In: Remington JS, Klein JO (eds). *Infectious diseases of the foetus and newborn*. Philadelphia, USA: WB Saunders. p 1184-1187.
20. **Talbot EA, Williams DL, Frothingham R.** 1997. PCR identification of *Mycobacterium bovis* BCG. *J Clin Microbiol* 35: 566-569. doi: 10.1128/JCM.35.3.566-569.1997
21. **Tomar RPS, Gupta A, Prasad TR, Bhalla PJS, Murthy GSN.** 2008. Congenital tuberculosis. *Med J Armed Forces* 64: 78-80.
22. **Vural SA, Tunca R.** 2001. Generalized tuberculosis in a 45-day-old calf. *Deut Tierarztl Woch* 108: 468-70.